# รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

**1. ชุดโครงการวิจัย** : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

**2. โครงการวิจัย** : การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs เพื่อรับรองสินค้า เกษตร

**3. ชื่อการทดลอง** : การผลิตโปรตีนมาตรฐานเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA Kit ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในเชิงพาณิชย์

**4. คณะผู้ดำเนินงาน**


| | | |
|---|---|---|
| **หัวหน้าการทดลอง** | : ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| **ผู้ร่วมงาน** | : ชนันต์ธร ดนัยสิริชัยชล | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| | : พงศกร สรรค์วิทยากุล | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| | : อรรคพล ภูมีศรี | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |


**5. บทคัดย่อ**


สังเคราะห์ยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp โคลนเข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย ทำบริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดโปรตีนขนาด 52 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 4.5 นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง แยกสกัด IgG จากแอนติบอดีปรับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 1:200 ทดสอบความใช้ได้ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS พบว่าแอนติบอดีมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS ในตัวอย่างถั่วเหลืองสด โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ และตัวอย่างโปรตีน EPSPS ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นในห้องปฏิบัติการกับชุดตรวจสอบทางการค้า (Agdia ELISA kit) ผลการทดสอบทั้งสองให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน


**6. คำนำ**

ประเทศไทยมีสภาพอากาศที่เหมาะสมกับการปลูกถั่วเหลือง แต่ปริมาณการปลูกถั่วเหลืองไม่เพียงพอสำหรับการบริโภคภายในประเทศ รัฐบาลจึงแก้ไขปัญหาโดยการนำเข้าถั่วเหลืองจากต่างประเทศในรูปเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง สำหรับการแปรรูปในอุตสาหกรรมเกือบ 80 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเหลืองที่นำเข้ามาจากประเทศบราซิล ร้อยละ 49 อาร์เจนตินา ร้อยละ 15 และอินเดีย ร้อยละ 15 จากสถานการณ์ในยุคปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกมีการวิจัยพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรม เพื่อการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตและลดความเสียหายจากการทำลายของแมลงศัตรูพืช พบว่าในปี 2546 มีประเทศปลูกพืชดัดแปรพันธุกรรมทั่วโลก 18 ประเทศ พืชดัดแปรพันธุกรรม

ที่ปลูกเป็นการค้ามากที่สุด คือ ถั่วเหลืองที่ต้านทานสารกำจัดวัชพืช หรือที่เรียกว่าถั่วเหลือง Roundup Ready ซึ่งเป็นของบริษัทมอนซานโต้ (Berdal and Holst-Jensen, 2001) โดยมีประเทศผู้ผลิตสำคัญ 3 อันดับแรกของโลก ได้แก่ ประเทศจีน ร้อยละ 28.58 รองลงมา ได้แก่ สหรัฐอเมริกา ร้อยละ 19.17 บราซิล ร้อยละ 15.72 อาร์เจนติน่า ร้อยละ 15.43 และในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงพัฒนาพืชดัดแปรพันธุกรรมอีกเป็นจำนวนมาก ด้วยการปรับปรุงยีนใหม่ๆ เพื่อตัดต่อในพืช จึงทำให้ประเทศหลายประเทศได้ออกกฎระเบียบการติดฉลากพืชดัดแปรพันธุกรรม โดยเฉพาะในสหภาพยุโรป เมื่อเดือนกรกฎาคม 2546 ได้ออกระเบียบที่เกี่ยวข้องกับพืชดัดแปรพันธุกรรม ในเรื่องการติดฉลากและการตรวจสอบย้อนกลับที่เข้มงวดกว่าเดิมและมีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 เมษายน 2547 กฎระเบียบดังกล่าวนี้ กำหนดให้ต้องมีการตรวจสอบสินค้าย้อนกลับไปทุกขั้นตอนตลอดห่วงโซ่การผลิตอาหารจนถึงการทดสอบระดับไร่นา และกำหนดให้สินค้าทุกชนิดที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมเกินร้อยละ 0.9 ซึ่งรวมถึงสินค้าที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ามีพืชดัดแปรพันธุกรรม แต่เป็นสินค้าที่ใช้พืชดัดแปรพันธุกรรมในกระบวนการผลิต เช่น น้ำมันถั่วเหลือง จะต้องติดฉลากด้วย โดยในกฎระเบียบเดิมสินค้าดังกล่าวไม่จำเป็นต้องติดฉลาก มีการระบุข้อความว่า “This product contains genetically modified organisms” ทั้งนี้กฎระเบียบดังกล่าวยังครอบคลุมถึงอาหารที่มีส่วนประกอบของพืชดัดแปรพันธุกรรมด้วย (นิรนาม, 2547)

จากกฎระเบียบดังกล่าว ส่งผลให้ประเทศไทยต้องประสบปัญหาและอุปสรรคมากเป็นพิเศษในการส่งสินค้าเกษตรออก เนื่องจากประเทศผู้นำเข้าใช้มาตรการเกี่ยวกับมาตรฐานและสุขอนามัยเพื่อควบคุมมาตรฐานสินค้า และอาจแอบแฝงการกีดกันทางการค้าไว้ด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งออกสินค้าที่เป็นผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองหรือมีส่วนผสมของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เนื่องจากผลผลิตถั่วเหลืองที่มีในประเทศไทยไม่เพียงพอต่อความต้องการ จึงต้องมีการนำเข้าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบเพื่อใช้ภายในประเทศและส่งออกในรูปของผลิตภัณฑ์แปรรูป การนำเข้าถั่วเหลืองของไทย ร้อยละ 80 สั่งจากประเทศที่เป็นแหล่งปลูกถั่วเหลือง GMOs ซึ่งมีโอกาสเป็นไปได้สูงที่จะปนเปื้อนด้วยถั่วเหลือง GMOs ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการส่งออกของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองก็มีโอกาสที่จะผลิตจากถั่วเหลือง GMOs เช่นเดียวกัน

เนื่องจากถั่วเหลืองที่ผลิตในประเทศเป็นผลผลิตจากธรรมชาติปราศจากปราศจากการตัดต่อพันธุกรรม ประชาชนและผู้บริโภคก็มีความวิตกกังวลเกี่ยวกับการบริโภคอาหาร GMOs และมีการเรียกร้องให้มีการติดฉลากสินค้า หรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของ GMOs ห้างสรรพสินค้าบางแห่งได้ออกมาตรการให้สินค้าที่จะนำมาวางขาย ต้องมีหนังสือรับรองว่าเป็นสินค้าที่ไม่ใช่ GMOs หรือไม่ได้ใช้วัตถุดิบที่ผลิตจาก GMOs นอกจากนี้ในหลายประเทศที่ซื้อสินค้าเกษตรของไทยได้กำหนดข้อจำกัดของส่วนผสมอาหาร GMOs โดยระบุเป็นจำนวนเปอร์เซ็นต์ของพืช GMOs ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนถั่วเหลือง GMOs ในเชิงปริมาณ (quantitative) สามารถระบุการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GMOs เป็นเปอร์เซ็นต์ได้ งานตรวจสอบการปนเปื้อน GMOs ในสินค้าเกษตรเป็นเทคโนโลยีค่อนข้างใหม่สำหรับประเทศไทย จึงจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบพืช GMOs ให้มีประสิทธิภาพ มีความแม่นยำ และเชื่อถือได้ เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการกำกับดูแลสินค้าเกษตร GMOs และสร้างมาตรการควบคุม ตรวจสอบ และออกหนังสือรับรองสินค้าพืช Non- GMOs

ขนิษฐา และคณะ ปี พ.ศ. 2552 ได้โคลนยีน *EPSPS* และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์แบคทีเรีย เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT kit เพื่อใช้ตรวจโปรตีน CP4EPSPS ในถั่วเหลืองต้านทานสารกำจัดวัชพืช

Honghong Wu *et a.l,* (2012) สังเคราะห์และเพิ่มปริมาณโปรตีน CP4EPEPS ในเซลล์แบคทีเรีย ตรวจสอบโปรตีนด้วยเทคนิค western blot นำโปรตีนที่ได้มาเป็นแอนติเจนเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบโปรตีน CP4EPEPS ในผลิตภัณฑ์แปรรูปจากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA

ข้อมูลจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ซึ่งมีหน้าที่โดยตรงในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์พืชที่นำเข้าจากต่างประเทศ ในการตรวจสอบโปรตีนชนิดนี้ นิยมใช้เทคนิค ELISA เนื่องจากสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ในปริมาณมากและการเตรียมตัวอย่างสะดวกกว่าวิธีการตรวจสอบแบบอื่น โดยทางสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชต้องซื้อชุดตรวจสอบ ELISA จากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาประมาณชุดละ 30,000 บาท ชุดตรวจสอบ 1 ชุด สามารถตรวจสอบได้ 2-10 ตัวอย่าง ประเทศไทยต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการซื้อชุดตรวจสอบนี้ Wei Wang (2000) นำ recombinant protein มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ยังคงคุณสมบัติของโปรตีนไว้ได้อย่างดี สามารถยืดเวลาเก็บรักษาโปรตีนไว้ได้ยาวนาน เพราะฉะนั้นการพัฒนา recombinant protein CP4EPEPS โดยการทำแห้งแบบเยือกแข็งเพื่อนำมาใช้เป็นโปรตีนมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์ถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมด้วยเทคนิค ELISA และพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบ (ELISA kit) ในเชิงพาณิชย์ จะเป็นการทดแทนการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ และลดต้นทุนการตรวจสอบพืชดัดแปรพันธุกรรม และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเฝ้าระวังและติดตามการแพร่ระบาดของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

**7. วิธีดำเนินการ**

**อุปกรณ์**

- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Innova)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge Beckman)
- ชุดทำให้เซลล์แตก (Bandelin HD3200)
- ชุดตรวจสอบและเคลื่อนย้ายเจลสู่เมมเบรน (Biorad Trans-Blot Sytem)
- ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Binder)
- ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส (Thermo scientific)
- ตู้เย็น -40 องศาเซลเซียส (Haier)
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Bosh)
- เครื่องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermo scientific)
- อุปกรณ์ สารเคมี ในการสกัดและเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย
- อุปกรณ์ สารเคมี ในการตรวจสอบขนาดและคุณภาพของโปรตีน

- อุปกรณ์ สารเคมี ในการผลิตและตรวจสอบคุณภาพของแอนติบอดี
- อุปกรณ์ สารเคมี ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

**วิธีการ**

**การเพิ่มปริมาณโปรตีน EPSPS ในระบบเซลล์แบคทีเรีย**

โคลนยีน *EPSPS* จากถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม เชื่อมต่อยีนเข้ากับพลาสมิด expression vector pET200 TOPO จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* BL21 คัดเลือกโคลนแล้วเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน ข้ามคืน เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้น (starter) เติม starter ลงในอาหารอาหาร 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (50 มิลลิกรัมต่อลิตร) เลี้ยงต่อนาน 2-5 ชั่วโมง จากนั้นชักนำให้เซลล์ผลิตโปรตีนเป้าหมายโดยเติม IPTG ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงต่ออีก 5 ชั่วโมง ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตะกอนเซลล์ 1 กรัม มาละลายด้วย 1X Phosphate buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม lysozyme แล้วบ่มที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อช่วยให้ผนังเซลล์แบคทีเรียแตกได้ดีขึ้น จากนั้นนำเซลล์มาผ่านเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD รุ่น 2200 ทำการ sonicate ให้เซลล์แบคทีเรียแตกจนสารละลายใส นำสารละลายเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีแยกเก็บส่วนใส (supernatant) ไปทำบริสุทธิ์โปรตีนด้วย column NI-NTA super flow (QiAGEN)

**การทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS**

ทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS ที่เพิ่มปริมาณในระบบเซลล์แบคทีเรียด้วยคอลัมน์ Ni-NTA supser flow โดยบรรจุคอลัมน์ด้วย Ni-NTA ปริมาตร 6 มิลลิลิตร รอให้ Ni-NTA จัดเรียงตัว ประมาณ 20 นาที ล้างคอลัมน์ด้วย buffer B ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตร Ni-NTA resin จากนั้นนำ supernatant ทั้งหมดมาผ่าน column เก็บสารละลายที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ไว้ (flow through) ล้าง column ด้วย washing buffer C (pH 6.3) ที่เติม tritonX 100 ให้มีความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร Ni-NTA เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แยกไว้ในหลอด เรียกว่า wash I และชะคอลัมน์ (elute) ด้วย elution buffer D (pH 5.9) ที่เติม tritonX 100 ให้มีความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตรแล้วทำการชะ (elute) โปรตีนที่เกาะอยู่ในคอลัมน์ออกด้วย elution buffer pH 4.5 ปริมาตร 10 เก็บสารละลายที่ผ่านคอลัมน์มาจำนวน 10 ส่วน (fraction) ใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรส่วนละ 1 มิลลิลิตร แต่ละส่วนเติม Tris-HCl, pH8.0 ปริมาตร 70 ไมโครลิตร เพื่อปรับสภาพให้โปรตีนอยู่ในสภาวะ pH ที่เป็นกลาง ตรวจสอบปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วนำโปรตีนที่ได้ไปกำจัดเกลือด้วยวิธีการ dialysis ในสารละลาย 1xPBS pH 7.4 ตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ผ่านการทำบริสุทธิ์อีกครั้งโดย Bradford’s method

**การตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดย Bradford's method**

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน EPSPS ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ เปรียบเทียบปริมาณจากการสร้างกราฟโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีการของชุดวิเคราะห์โปรตีน Bio-Rad Assay (บริษัท BIO-RAD) ซึ่งอาศัยหลักการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนของ (Bradford, 1976) โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน และ Dye Reagent Concentrate เตรียมสารละลาย Coomassie blue dye โดยผสม dye reagent เข้มข้น 1 ส่วน กับน้ำกลั่น 4 ส่วน (v/v) ผสมให้เข้ากันแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 เพื่อกรองเอาเศษตะกอนออก เก็บสารละลาย dye ที่เจือจางแล้วในหลอดทึบแสงเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (dye ที่เจือจางแล้วควรใช้ภายใน 2 สัปดาห์) เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยชั่ง BSA หนัก 10 มิลลิกรัมละลายใน 1xPBS pH 7.4 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง BSA ที่ระดับความเข้มข้น 5, 4, 3, 2, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมสารละลาย Coomassie blue dye20 ไมโครลิตร ที่เจือจางแล้วกับสารละลาย BSA แต่ละความเข้มข้น 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง $OD_{595}$ทำจำนวน 4 ซ้ำ ของแต่ละความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นนำข้อมูลมา plot กราฟ และสร้างสมการเส้นตรงที่เหมาะสมด้วย Least square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จะได้กราฟมาตรฐาน ทำการเจือจางโปรตีน EPSPS กับ Coomassie blue dye เช่นเดียวกัน นำค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{595}$ ของโปรตีน EPSPS แทนค่าในสมการเส้นตรงที่ได้จากการตรวจวัดค่าโปรตีนมาตรฐาน

**การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย**

กระต่ายที่ใช้เป็นสัตว์ทดลองเป็นกระต่ายเพศเมียพันธุ์ White New Zealand อายุประมาณ 3 เดือนและมีน้ำหนักประมาณ 2.0 กิโลกรัมโดยเจาะเลือดกระต่ายในสัปดาห์แรกเพื่อใช้เป็นซีรัมปกติ (normal serum, Ns) เตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองโดยใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 และฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection, SC) จำนวน 5 จุด จุดละประมาณ 200 ไมโครลิตร ฉีดกระตุ้นภูมิในสัตว์ทดลองอีก 3 ครั้งโดยผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) เจาะเลือดที่เส้นเลือดบริเวณใบหูครั้งแรกในสัปดาห์ที่ 6 โดยใช้บีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อครั้งละ 20 มิลลิลิตรและทำการเจาะเลือดทุกๆ สัปดาห์ จนครบ 10 ครั้ง แยกแอนติบอดีจากเม็ดเลือดแดงโดยเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรีดรอบก้อนเลือดด้วยเข็มฉีดยาแล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืนจากนั้นหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงด้วยแรงเหวี่ยง 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีเก็บส่วนซีรัมและเติม 2% $NaN_3$ ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 0.02% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS ด้วยเทคนิค indirect ELISA

**การตรวจสอบค่าไตเตอร์ (Titer) ของแอนติซีรัมด้วยเทคนิค indirectELISA**

การตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตได้ต่อโปรตีน EPSPS ซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของ $A_{405}$ของซีรัมปกติ, Normal serum) ด้วยวิธีการ indirect ELISA ตามวิธีการของ Clark และ Adam (1977) โดยการเคลือบหลุม micro plate ด้วย โปรตีน EPSPS ที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างออกด้วย PBST (PBS ที่ผสม 0.05% Tween20 ) หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (2% skim milk, sigma, St. Louis, USA) ที่ละลายใน PBST)หลุมละ50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้น เป็นเวลานาน 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติมแอนติซีรัมที่เจือจางด้วย blocking solution แบบ 2 เท่า (2 fold-dilutions) โดยเริ่มต้นเจือจางที่ความเข้มข้น 1:100-1:1,638,400 หลุมละ 50 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นนาน 60 นาที ล้างออกด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม GAR-conjugated (Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase)เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร 5 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเติมสารละลายสับเสตรท*p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน 10% Diethanolamine หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องความชื้นและมืดเป็นเวลา 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3N NaOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405}$) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของซีรัมปกติ ที่ให้ค่าเป็นบวก

**การแยกสกัดและทดสอบประสิทธิภาพอิมมูโนโกลบูลิน**

การแยกสกัด IgG โดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) โหลด Binding buffer ผ่านคอลัมน์ปริมาตร 10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ นำแอนติซีรัมไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เจือจางแอนติซีรัมกับ Binding buffer อัตราส่วน 1:9 โหลดแอนติซีรัมผ่านคอลัมน์ที่อัตราไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ล้างคอลัมน์ด้วย Binding buffer ปริมาณ 5-10 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยสังเกตจากกราฟค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{280}$ (UV1_280) จากนั้นจึงชะ IgG บริสุทธิ์ด้วย Elution buffer เก็บสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์แต่ละ fraction จำนวน 10 fraction ปรับสภาพของ IgG ด้วย 0.05 เท่าของปริมาตร IgG ด้วย neutralizing buffer ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{280}$ โ'ยใช้ค่า Extinction coefficient ของ IgG เพื่อปรับ pH ของ IgG ให้เป็นกลางคำนวณความเข้มข้นของ IgG ที่แยกได้จากสูตร O.D.280/1.4 = X มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Clark และ Adam, 1977)

ทดสอบหาค่าความเจือจางต่ำสุดของ IgG ที่แยกจากแอนติซีรัมต่อโปรตีน EPSPS ด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน เก็บ fraction ที่กราฟแสดงช่วงที่ชะ IgG จากคอลัมน์ ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD._{280}$ ปรับความ

เข้มข้นของ IgG ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางความเข้มข้นของ IgG ในสารละลาย 1XPBS pH 7.4 เริ่มต้นที่ 1:200 ถึง 1:12,800 ทดสอบหาค่าความเจือจางของ IgG แต่ละระดับความเข้มข้นต่อการเกิดปฏิกิริยากับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรันต่อไมโครลิตรด้วยเทคนิค indirect ELISA จำนวน 5 ซ้ำ อ่านผลการตรวจสอบที่ 30 นาทีหลังเติมสับสเตรท

**การหาค่าความเจือจางของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค indirect ELISA**

ปรับความเข้มข้นโปรตีนEPSPS บริสุทธิ์เริ่มต้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางโปรตีน EPSPS ในสารละลาย Coating buffer pH 9.6 ที่ระดับความเข้มข้น 1:2-1:2,048 (แบบ 2 fold –dilution) ค่าความเจือจางละ 5 ซ้ำ ใช้ IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจือจาง 1:200 และใช้ goat anti rabbit IgG เจือจาง 1:10,000 เพื่อตรวจดูระดับความเจือจางต่ำสุดของโปรตีนที่ IgG ต่อ EPSPS สามารถตรวจสอบได้ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405}$) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่เวลา 30 นาทีหลังเติมสารละลายสับสเตรท กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของสารละลาย buffer ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

**การเตรียมตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชสำหรับทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA**

นำตัวอย่างถั่วเหลืองที่ตรวจพบยีน EPSPS โดยเทคนิค real time PCR มาคัดเลือกเมล็ดที่มีความต้านทานสารกำจัดวัชพืช โดยการแช่ในสารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.12% เป็นเวลา 30 นาที นำถั่วเหลืองมาเพาะให้ต้นเจริญเติบโต โดยเพาะถั่วเหลืองที่ตรวจไม่พบยีน EPSPS ควบคู่กันไปเพื่อใช้เป็น negative control ทดสอบเปรียบเทียบผลการใช้เทคนิค indirect ELISA ที่ใช้ IgG ผลิตแอนติบอดีจาก recombinant protein EPSPS เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำ และประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ ELISA ในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช

**การทำแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีนและแอนติบอดี**

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งตัวอย่างโปรตีน

เจือจางโปรตีน EPSPS ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในสารละลาย coating buffer pH 9.6 ที่ 4 ระดับความเข้มข้นคือ 10, 100, 200 และ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โหลดตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตรลงในหลุมไมโครเพลทชนิด 96 หลุม แช่ตัวอย่างในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำตัวอย่างจากออกจากตู้-40 องศาเซลเซียส เข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส ความดัน 132 mPa ซึ่งจะทำให้การระเหิดของผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และรักษาโครงสร้างของตัวอย่างไม่ให้เกิดความเสียหาย จนกระทั่ง ชั้นของน้ำแข็งระเหิดไปกลายเป็นชั้นแห้งเคลือบผิวหน้าของ ไมโครเพลท

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดี

แยกสกัด IgG ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPEPS ด้วยด้วยชุดสกัด Protein A Chromatography จากนั้น desalting ให้ IgG อยู่ในสารละลาย 100 mM sodium phosphate buffer

ตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ $OD._{280}$ เจือจางความเข้มข้นของแอนติบอดีให้ได้ความเข้มข้นที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง IgG ในอัตราส่วน 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 โหลด IgG แต่ละความเข้มข้นในปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไมโครเพลทแช่ที่ อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไมโครเพลทออกจากตู้ -40 องศาเซลเซียส แล้วรีบนำเข้าเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้สภาวะสุญญากาศ จนกว่า IgG จะแห้งสนิทติดบนผิวไมโครเพลท

**การตรวจสอบตัวอย่างที่ทำแห้งแบบเยือกแห้งด้วยเทคนิค indirect ELISA**

- การตรวจสอบตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีนด้วยเทคนิค indirect ELISA

ตรวจสอบความใช้ได้ของตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งด้วยเทคนิค indirect ELISA นำไมโครเพลทที่เคลือบด้วยโปรตีน EPSPS ล้างด้วย PBS-T หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 5 ครั้ง เขย่าบนเครื่องล้างไมโครเพลท ครั้งละ 3 นาที เติมแอนติบอดีที่เจือจาง 1:200 ในตัวอย่างโปรตีนแต่ละความเข้มข้น จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T อีกครั้ง จากนั้นเติมแอนติบอดีตัวที่ 2 ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อแอนติบอดีตัวที่ 1 คือ goat anti rabbit IgG เจือจาง 1:10,000 บ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมงล้างไมโครเพลทด้วย PBS-T ก่อนเติมสารละลายสับเสตรท *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ละลายใน 10% Diethanolamine หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405}$) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่เวลา 15 นาทีหลังเติมสารละลายสับสเตรท กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของสารละลาย buffer ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

- การตรวจสอบตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA

จากการผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งของ IgG ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ทั้ง 4 ระดับ คือ1:100, 1:200, 1:400, 1:800 IgG เคลือบติดพื้นผิวไมโครเพลทไว้ เติมตัวอย่างโปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจาง 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 200 ไมโครลิตร ปล่อยให้ IgG ที่เคลือบไว้บนพื้นผิวไมโครเพลทจับกับโปรตีนเป้าหมายที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS-T จากนั้นเติม IgG อีกครั้งเพื่อให้ตรวจจับกับแอนติเจนในส่วนของอิพิโทปที่เหลืออยู่อีกด้านหนึ่งของโปรตีนที่เป็นแอนติเจน บ่มให้ IgG ทำปฏิกิริยากับโปรตีน ที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจสอบขั้นตอนต่อไปเช่นเดียวกับการทำ indirect ELISA ตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405}$) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader ที่เวลา 15 นาทีหลังเติมสารละลายสับสเตรท เปรียบเทียบผลการตรวจสอบกับโปรตีน BSA ที่เป็น negative control กำหนดค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่า 2 เท่าของ negative control เป็นบวก

**การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม**

พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่เพิ่มปริมาณและสังเคราะห์โปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย จากนั้นนำโปรตีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม

ต่อมิลลิลิตร เจือจางโปรตีนบริสุทธิ์ในผงถั่วเหลืองที่ระดับความเจือจาง 1:1, 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 เปรียบเทียบผลการทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ใช้แอนติบอดีเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจือจาง 1:200 โดยใช้สับสเตรท 2 ชนิดคือ Alkaline Phosphatase (AP) และ Horseradish Peroxidase (HRP) เพื่อคัดเลือกชนิดสับสเตรทที่เหมาะสมไปใช้พัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ในเชิงพาณิชย์ และเปรียบเทียบผลตัวอย่างเดียวกันกับชุดตรวจสอบทางการค้า Agdia (Roundup Ready CP4EPSPS, USA)

**เวลาและสถานที่**

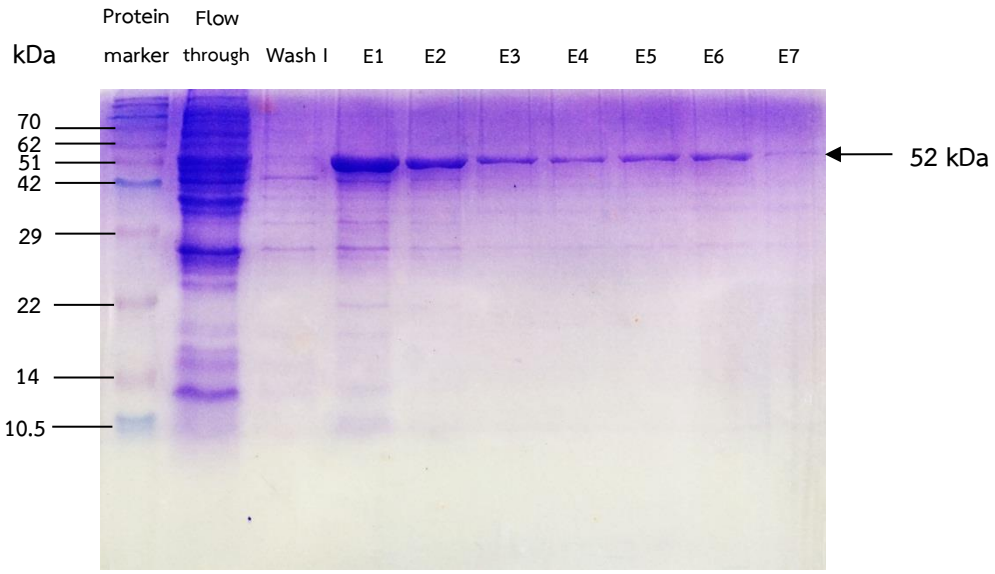
ระยะเวลาดำเนินการ : ตุลาคม 2557 – กันยายน 2558

สถานที่ดำเนินการ : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

**ผลการเพิ่มปริมาณและทำบริสุทธิ์โปรตีนEPSPS**

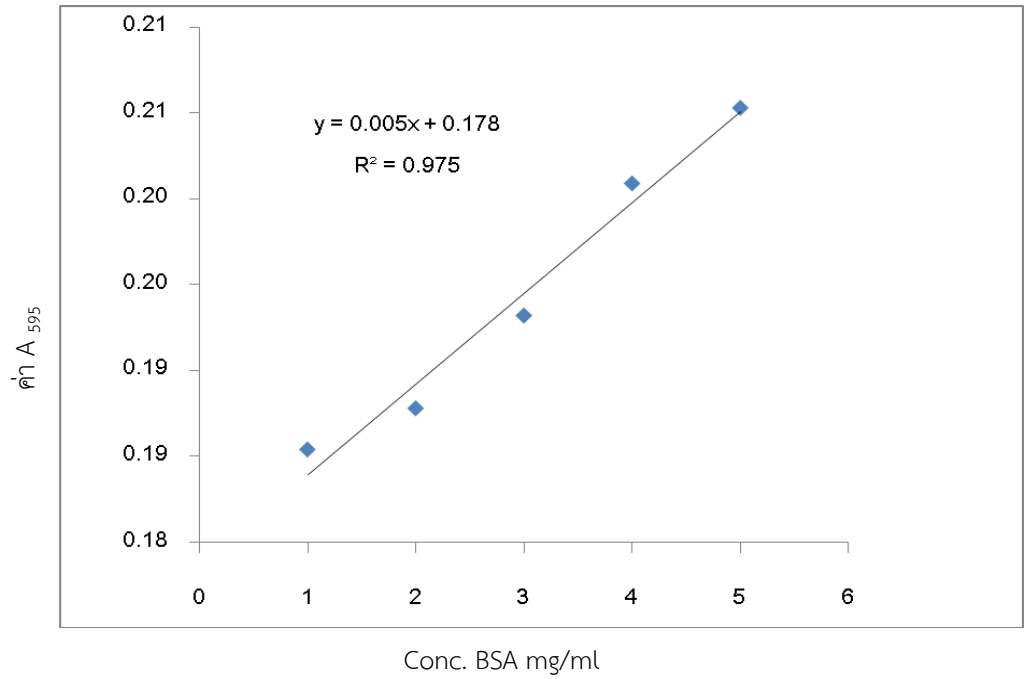
การสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณ recombinant protein EPSPS เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีน EPSPS ที่มีความบริสุทธิ์และมีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้เป็น positive control สำหรับการพัฒนาชุดตรวจสอบโปรตีน EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืช พบว่าการแสดงออกของโปรตีนภายใต้การชักนำของ 1mM IPTG ที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณโปรตีน EPSPS โดยให้ปริมาณโปรตีนมากเพียงพอมีปริมาณโปรตีนของเซลล์เจ้าบ้านในปริมาณน้อย เมื่อทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS พบโปรตีนเป้าหมาย EPSPS ใน fraction ที่ 1-7 (ภาพที่ 1) ขนาดโปรตีนเท่ากับ 52 กิโลดาลตัน ซึ่งมีความบริสุทธิ์ในส่วนของน้ำใสที่ elute ด้วย Elution buffer pH 4.5 ซึ่งได้แถบโปรตีนเป้าหมายโปรตีนเดียว ไม่มีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อน




**ภาพที่ 1** แสดงแถบโปรตีนขนาดต่างๆ ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โปรตีน EPSPS ของถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม ซึ่งพบในส่วน Flow through, Wash I และ E1-E7 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE

**ผลการตรวจสอบปริมาณโปรตีนโดย Bradford's method**

จากการเลี้ยงและเพิ่มปริมาณโปรตีน EPSPS เมื่อตรวจสอบขนาดของโปรตีนเป้าหมาย ได้ขนาด 52 กิโลดาลตัน แล้วจึงเพิ่มปริมาณ EPEPS ให้มีปริมาณมาก นำมากำจัดเกลือโดยการ dialysis ตรวจวัดปริมาณโดย Bradford's method เปรียบกับค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ระยะเวล 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ $A_{595}$ได้ค่าสมการ Y=0.005x+0.178 ค่าระดับความเชื่อมั่น $R^2$ 0.975 หรือที่ 97.5% ภาพที่ 2 นำค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน EPSPS แทนค่า Y ในสมการข้างต้น คำนวณค่า X จากสมการได้ความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS ที่บริสุทธิ์หลังจากการทำ dialysis แล้วดึงสารละลายบัฟเฟอร์ออกโดยใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ให้เพื่อให้ได้โปรตีน EPSPS ที่มีความเข้มข้นสำหรับนำไปใช้สำหรับทดสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อไป ซึ่งตรวจวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีน EPSPS จากการเพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรียปริมาณโปรตีนทั้งหมด 2 ลิตร และทำบริสุทธิ์โปรตีนจำนวน 4 ครั้งได้ปริมาณความเข้มข้นโปรตีน EPSPS เท่ากับ 70.6, 30.4, 24.0, 44.07 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1)




**ภาพที่ 2** แสดงสมการการตรวจวัดปริมาณโปรตีนมาตรฐานที่ A $_{595}$ ที่ระดับความเข้มข้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อ่านผลการเกิดปฏิกิริยาที่ 5 นาที

**ตารางที่ 1** แสดงผลการตรวจวัดปริมาณโปรตีน EPSPS จากการตรวจวัดโดย Bradford's method เปรียบเทียบค่าจากสมการการตรวจวัดโปรตีนมาตรฐาน (Y=0.005x+0.178)

| ชนิดตัวอย่าง | ค่า A $_{595}$ | ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Y=0.005x+0.178) |
|---|---|---|
| EPSPS1 | 0.531 | 70.6 |
| EPSPS2 | 0.330 | 30.4 |
| EPSPS3 | 0.298 | 24.0 |
| EPSPS4 | 0.398 | 44.07 |

**ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย**

การผลิตแอนติบอดี คุณภาพของแอนติบอดีที่มีคุณภาพขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายๆ ปัจจัย อย่างเช่น อายุและสุขภาพของสัตว์ทดลอง การเลี้ยงดูสัตว์ระหว่างการทดลอง และคุณภาพของแอนติเจนที่ดี การผลิตแอนติบอดีโดยใช้ recombinant protein EPSPS เป็นแอนติเจนในการฉีดกระตุ้น พบว่าเมื่อตรวจสอบค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เจาะเลือดจากกระต่ายมาทั้งหมด 10 ครั้ง ค่าไตเตอร์ของสัตว์ทดลองมีค่าสูงขึ้น เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นแอนติเจนในการทดสอบ โดยแอนติซีรัมที่ 5 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุด (ภาพที่ 3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1:3,876,800 ซึ่งค่าไตเตอร์จากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยแอนติเจนจำนวน 4 ครั้ง พบว่าค่าไตเตอร์ที่ตรวจวัดด้วยเทคนิค indirect ELISA มีค่าค่อนข้างสูง (ตารางที่ 2) เหมาะสำหรับการนำไปแยกสกัด IgG ให้ได้ IgG ที่มีความบริสุทธิ์และมีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน EPSPS เพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมให้ต้านทานสารกำจัดวัชพืชต่อไป

**ผลการแยกสกัดอิมมูโนโกลบูลิน**

IgG ที่จำเพาะต่อโปรตีน EPSPS ซึ่งแยกสกัดโดยใช้ชุดสกัด HiTrap Protein A HP ผ่านเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีน (ÄKTA chromatography) ที่กำหนดอัตราการไหลผ่านของแอนติซีรัมที่ไหลในคอลัมน์ภายใต้ความดันและสภาวะเหมาะสม จากการนำแอนติซีรัมมาแยกสกัด IgG จำนวน 1 มิลลิลิตร แยกเก็บ fraction ดังแสดงกราฟที่ $OD_{280}$ ในช่วงการชะ IgG ที่ติดอยู่ที่คอลัมน์ซึ่งสามารถติดตามผลการแยกสกัด IgG ได้ตลอดขั้นตอนการทำงาน เลือกเก็บ fraction ที่มีค่าพื้นที่ใต้กราฟเท่ากับ 1504.5210 ml*mAu (ภาพที่ 4) วัดค่า $OD_{280}$ 4.432 คิดเป็นความเข้มข้นของ IgG ได้เท่ากับ 3.165 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 3) นำ IgG ที่แยกสกัดได้เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อนำไปศึกษาต่อ

**ผลการทดสอบประสิทธิภาพอิมมูโนโกลบูลิน**

- การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินด้วยเทคนิค indirect ELISA

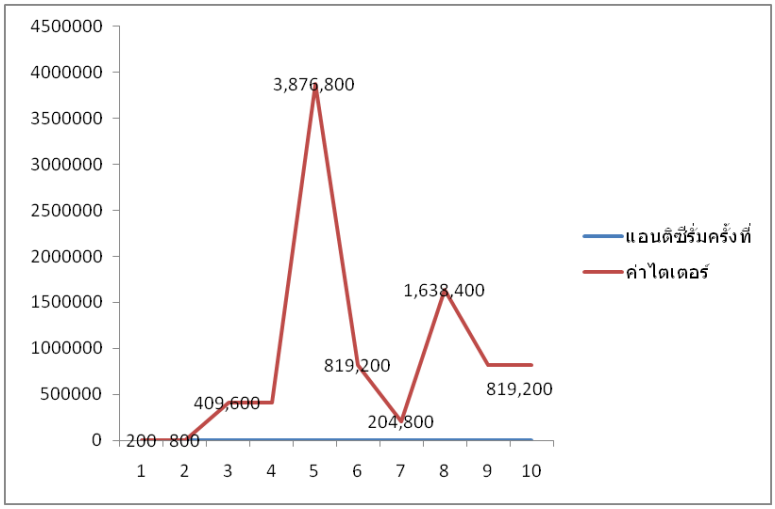
จากการเจือจาง IgG ที่ระดับความเข้มข้น 1:200-1:12,800 เพื่อหาค่าความเจือจางต่ำสุดของ IgG ต่อโปรตีน EPSPS ที่ระดับความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องชัดเจน ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ Carbonate coating buffer ที่ใช้เป็น Negative control เมื่อตรวจวัดค่า $A_{405}$ ที่เวลา 30 นาที หลังการเติมสับสเตรท พบว่าระดับความเจือจางต่ำสุดของ IgG ที่สามารถตรวจสอบโปรตีน EPSPS ได้อย่างจำเพาะเจาะจงคือค่าความเจือจางต่ำสุดที่ 1:1,600 มีค่าเท่ากับ 0.322 ซึ่งมากกว่า 2 เท่าของสารละลาย Carbonate coating buffer ระดับความเจือจางที่ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนสามารถอ่านผลการตรวจสอบได้ในระดับสายตาอย่างชัดเจนคือระดับความเจือจางที่ 1:200-1:400 ค่า $OD_{405}$ เท่ากับ 1.545 และ 0.884 (ตารางที่ 4) เพราะฉะนั้นที่ระดับความเจือจางของ IgG ที่เหมาะสมในการนำไปทดสอบความสามารถในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความจำเพาะเจาะจงสูง สามารถวิเคราะห์ผลได้ในการอ่านผลในระดับสายตาโดยไม่จำเป็นต้องตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงซึ่งเหมาะกับการนำไปพัฒนาชุดตรวจสอบ

- การหาค่าความเจือจางของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค indirect ELISA

ระดับความเจือจางสูงสุดของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ที่ IgG สามารถตรวจสอบได้แสดงให้ถึงคุณภาพของแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพ จากการเจือจางแอนติเจนที่ระดับ 1:2-1:2,048 ซึ่งคิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.48 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ค่า $OD_{405}$ มีค่าอยู่ในช่วง 1.309 -0.286 ถือเป็นระดับที่ต่ำมากกว่า 1 นาโนกรัม และระดับความเจือจางของโปรตีน EPSPS ที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ที่สุด คือ ค่าความเจือจางที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการจับกับพื้นที่ผิวของ microplate ELISA แสดงว่าปริมาณโปรตีนที่มากกว่าระดับนี้ อาจมีโปรตีนมากเกินไปจนเกิดเป็นส่วนเกินในการจับกับพื้นผิวของ microplate ELISA แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ IgG บริสุทธิ์ในอัตราส่วน 1:200 เป็นอัตราส่วนที่มีประสิทธิภาพในการตรวจจับกับแอนติเจนซึ่งเป็นโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ได้อย่างถูกต้องมีประสิทธิภาพที่ระดับความเจือจาง 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด (ตารางที่ 5)

- การทดสอบตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชด้วยเทคนิค indirect ELISA

เมื่อนำถั่วเหลืองที่ตรวจพบยีน *EPSPS* ด้วยเทคนิค real-time PCR ไปแช่สารละลาย สารละลายไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.12% จำนวน 3 ตัวอย่าง แล้วนำเมล็ดถั่วเหลืองไปเพาะต้นกล้าเพื่อนำมาตรวจสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพและความจำเพาะเจาะจงของชุดตรวจสอบ ELISA ที่พัฒนาขึ้น กับเทคนิคการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR เบื้องต้นจากการคัดเลือกถั่วเหลืองมา 3 ตัวอย่าง เมื่อเพาะและนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้ IgG ที่แยกสกัดจากแอนติบอดีต่อโปรตีน EPSPS ในระดับความเจือจาง 1:200 ที่เวลา 30 นาที หลังเติมสับสเตรท พบถั่วเหลืองจำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบโปรตีน EPSPS ให้ค่าการตรวจสอบที่ $OD_{405}$ อยู่ในช่วง 0.5530-0.7866 (ตารางที่ 6) แต่ให้ผลการตรวจสอบที่ไม่ชัดเจนมากนัก เมื่อเทียบกับโปรตีน EPSPS เพราะคุณสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์ในระบบเซลล์แบคทีเรียต่างจากโปรตีนธรรมชาติแต่อย่างไรก็ตามยังมีคุณสมบัติบางส่วนคล้ายคลึงกันที่สามารถเป็นแอนติเจน อีกทั้งถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในสภาพการปลูกในธรรมชาติมีการผลิตโปรตีนได้มากน้อยแตกต่างกัน และโปรตีนที่สกัดจากต้นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมจะมีโปรตีนอื่นของพืชปนเปื้อนบางส่วน ซึ่งจะส่งผลกระทบกับการเข้าจับกับโปรตีนเป้าหมายของแอนติบอดี จึงมีความจำเป็นต้องศึกษาหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของตัวอย่างต้นถั่วเหลืองต่อสารละลายที่ใช้บดตัวอย่างเพื่อให้ได้อัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้บดตัวอย่างโดยไม่มีผลกระทบกับการเกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA



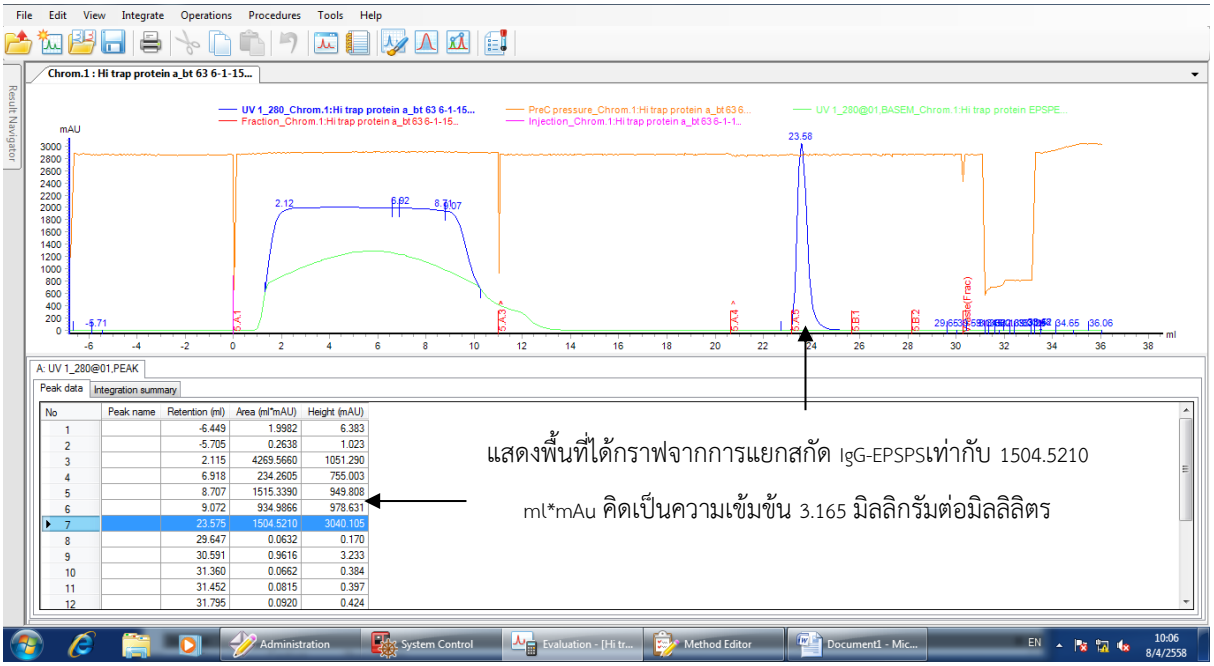

**ภาพที่ 3** ค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมครั้งที่ 1-10 เมื่อใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA อ่านผลการตรวจสอบที่เวลา 30 นาที หลังเติมสับสเตรท

**ตารางที่ 2** โปรแกรมการฉีดแอนติเจนการเก็บเลือดและค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ผลิตในกระต่ายทำปฏิกิริยากับโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| สัปดาห์ที่ | แอนติเจน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | แอดจูแวนต์ | ปริมาตรที่ฉีด (มิลลิลิตร) | ชนิดซีรั่ม | ค่าไตเตอร์ตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | - | - | - | NS | |
| 2 | 1.0 | CFA/1 | 1.0 | - | - |
| 3 | 1.0 | IFA/2 | 1.0 | - | - |
| 4 | 1.0 | IFA/2 | 1.0 | - | - |
| 5 | 1.0 | IFA/2 | 1.0 | - | - |
| 6 | | | | AS | 200 |
| 7 | | | | AS | 800 |
| 8 | | | | AS | 409,600 |
| 9 | | | | AS | 409,600 |
| 10 | | | | AS | 3,876,800 |
| 11 | | | | AS | 819,200 |
| 12 | | | | AS | 204,800 |
| 13 | | | | AS | 1,638,400 |
| 14 | | | | AS | 819,200 |
| 15 | | | | AS | 819,200 |

**หมายเหตุ** - /1 complete Freund's adjuvant

- /2 incomplete Freund's adjuvant
- ค่า $A_{405}$ เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำจากการอ่านผลที่เวลา 30 นาทีหลังจากเติมสับสเตรท
- Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า $A_{405}$ ได้ 0.102
- Carbonate coating buffer pH 9.6 ที่แอนติซีรัมเจือจาง 1:200 วัดค่า A405 ได้ 0.120
- ค่า $A_{405}$ ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่าให้ผลเป็นบวก




**ภาพที่ 4** แสดงพื้นที่ใต้กราฟจากการแยกสกัด IgG-EPSPS แต่ละ fraction ตรวจวัดที่ค่า $OD_{280}$ แสดงผล ณ เวลาจริงที่แยกสกัด IgG

**ตารางที่ 3** ผลการตรวจวัดความเข้มข้น IgG แต่ละ fraction จากการสกัดด้วยเครื่องทำบริสุทธิ์โปรตีนที่ $OD_{280}$

| fraction | ค่าเฉลี่ย $OD_{280}$ | ความเข้มข้นโปรตีนสูตร $OD_{280}/1.4 = X$ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) |
|---|---|---|
| EPSPS-5A3 | 0.939 | 0.670 |
| EPSPS-5A4 | 0.956 | 0.682 |
| EPSPS-5A5 | 4.432 | 3.165 |

**ตารางที่ 4** ค่าความเจือจางสูงสุดของ IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ เข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรเป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| | ค่า $A_{405}$ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ระดับความเจือจาง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ค่าเฉลี่ย | ผลการทดสอบ |
| Coating buffer | 0.1520 | 0.1300 | 0.1380 | 0.1580 | 0.1600 | 0.1476 | - |
| 1:200 | 1.5980 | 1.5160 | 1.5130 | 1.5540 | 1.5470 | 1.545 | + |
| 1:400 | 0.8950 | 0.9380 | 0.8470 | 0.8840 | 0.8560 | 0.884 | + |
| 1:800 | 0.0560 | 0.5060 | 0.4850 | 0.4940 | 0.5180 | 0.411 | + |
| 1:1,600 | 0.3320 | 0.3320 | 0.3100 | 0.3240 | 0.3130 | 0.322 | + |
| 1:3,200 | 0.2600 | 0.3320 | 0.3540 | 0.2340 | 0.2300 | 0.282 | - |
| 1:6,400 | 0.2400 | 0.2300 | 0.2120 | 0.2300 | 0.2200 | 0.226 | - |
| 1:12,800 | 0.2380 | 0.2280 | 0.2060 | 0.2120 | 0.1800 | 0.212 | - |

**หมายเหตุ** - ค่า $A_{405}$ เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำจากการอ่านผลที่เวลา 30 นาทีหลังจากเติมสับสเตรท

- ผลการทดสอบ – คือ ไม่เกิดปฏิกิริยาโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์

**-** ผลการทดสอบ + คือ เกิดปฏิกิริยาโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์

**ตารางที่ 5** ค่าความเจือจางสูงสุดของโปรตีน EPSPS บริสุทธิ์ ที่สามารถตรวจสอบได้โดยใช้ IgG-EPSPS เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจือจาง 1:200 ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| | ค่า $A_{405}$ | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ระดับความเจือจาง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ค่าเฉลี่ย | ผลการทดสอบ |
| Coating bf. | 0.101 | 0.113 | 0.124 | 0.112 | 0.115 | 0.114 | - |
| 1 | 1.185 | 1.294 | 1.227 | 1.265 | 1.297 | 1.254 | + |
| 1:2 | 1.308 | 1.345 | 1.332 | 1.320 | 1.241 | 1.309 | + |
| 1:4 | 1.187 | 1.336 | 1.340 | 1.266 | 1.264 | 1.279 | + |
| 1:8 | 1.186 | 1.187 | 1.287 | 1.263 | 1.313 | 1.247 | + |
| 1:16 | 1.232 | 1.264 | 1.257 | 1.200 | 1.266 | 1.244 | + |
| 1:32 | 1.250 | 1.355 | 1.286 | 1.224 | 1.275 | 1.278 | + |
| 1:64 | 1.289 | 1.387 | 1.309 | 1.358 | 1.359 | 1.340 | + |
| 1:128 | 1.209 | 1.257 | 1.214 | 1.199 | 1.054 | 1.187 | + |
| 1:256 | 0.955 | 0.991 | 0.976 | 0.928 | 0.719 | 0.914 | + |
| 1:512 | 0.770 | 0.748 | 0.747 | 0.698 | 0.516 | 0.696 | + |
| 1:1,024 | 0.234 | 0.210 | 0.216 | 0.240 | 0.286 | 0.298 | + |
| 1:2,048 | 0.220 | 0.266 | 0.248 | 0.217 | 0.264 | 0.286 | + |

**หมายเหตุ** - ค่า $A_{405}$ เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำจากการอ่านผลที่เวลา 30 นาทีหลังจากเติมสับสเตรท

- ผลการทดสอบ – คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS

**-** ผลการทดสอบ + คือ เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS

**ตารางที่ 6** ผลการตรวจสอบตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมต้านทานสารกำจัดวัชพืชได้โดยใช้ IgG-EPSPS เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเจือจาง 1:200 ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| | ค่า $A_{405}$ | | | | | | ผลการ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ระดับความเจือจาง | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ค่าเฉลี่ย | ทดสอบ |
| Coating bf. | 0.0950 | 0.1120 | 0.1381 | 0.1080 | 0.1100 | 0.1126 | - |
| โปรตีน EPSPS | 1.2321 | 1.2120 | 1.1330 | 1.3242 | 1.2211 | 1.2244 | + |
| ถั่วเหลือง2861 | 0.6980 | 0.6160 | 0.6130 | 0.6540 | 0.6470 | 0.6640 | + |
| ถั่วเหลือง2779 | 0.5950 | 0.5340 | 0.5450 | 0.5640 | 0.5260 | 0.5530 | + |
| ถั่วเหลือง2780 | 0.7550 | 0.8040 | 0.8.221 | 0.7951 | 0.7924 | 0.7866 | + |

**หมายเหตุ** - ค่า $A_{405}$ เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำจากการอ่านผลที่เวลา 30 นาทีหลังจากเติมสับสเตรท
- ผลการทดสอบ – คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS
- ผลการทดสอบ + คือ เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS

**ผลการทำแห้งแบบเยือกแข็งของโปรตีนและแอนติบอดี**

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็ง

จากการเคลือบผิวไมโครเพลทด้วยโปรตีน EPSPS ที่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเทคนิค Bradford's method จากนั้นเจือจางความเข้มข้นโปรตีนที่ระดับ 10, 100, 200 และ 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำโปรตีนไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าโปรตีนปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุมใช้เวลาในการทำแห้งที่ ทำแห้งแบบเยือกแข็ง -80 องศาเซลเซียส ความดัน 132 mPa เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตัวอย่างจะแห้งสนิทติดบนผิวไมโครเพลทสามารถนำตัวอย่างไปเก็บไว้สำหรับใช้เป็น positive control สำหรับการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้

- การทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดี

แอนติบอดีที่แยกสกัด IgG ด้วยชุดสกัด protein A เมื่อเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมความสามารถในการตรวจจับกับแอนติเจนเป้าหมายของแอนติบอดีก็จะคงสภาพที่ดีไว้ได้นาน จึงทำการทดสอบตรึงแอนติบอดีในรูป IgG ให้เคลือบติดผิวไมโครเพลทไว้สำหรับตรวจสอบโปรตีนเป้าหมายโดยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจจับแอนติเจนให้มากยิ่งขึ้น จากการเคลือบ IgG แล้วผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งภายใต้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ความดัน 132 mPa เป็นเวลา 1 สัปดาห์ เบื้องต้นพบว่า IgG แห้งเคลือบติดพื้นผิวไมโครเพลทไว้ได้อย่างดี

**ผลการตรวจสอบตัวอย่างที่ทำแห้งแบบเยือกแห้งด้วยเทคนิค indirect ELISA**

จากการตรวจสอบความใช้ได้ของโปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจางที่แตกจ่างกัน เมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าโปรตีนยังคงสภาพได้เป็นอย่างดี ทุกระดับความเจือจางที่นำมาทดสอบยังคงสภาพและโครงสร้างของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนได้เป็นอย่างดี แม้ว่าในระดับความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทดสอบคือ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ให้การดูกลืนแสงที่ $A_{405}$ เท่ากับ 2.565 ที่ระดับความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุดขึ้นไปในการทดสอบคือ 100, 200, 400 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 3.575, 3.033, 3.611 ตามลำดับ เพราะฉะนั้นแสดงให้เห็นว่าระดับความเจือจางของโปรตีนที่สามารถนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็งสามารถใช้โปรตีนที่ระดับต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรได้

**ผลการตรวจสอบตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของแอนติบอดีด้วยเทคนิค indirect ELISA**

จากการเคลือบไมโครเพลทด้วย IgG ที่ระดับความเจือจางที่แตกต่างกันนั้น พบว่าเมื่อเจือจาง IgG ที่ระดับต่ำที่ 1:800 พบว่า IgG ในสภาพตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งที่ระดับความเจือจางดังกล่าวยังคงคุณสมบัติในการตรวจจับกับโปรตีนเป้าหมายได้เป็นอย่างดี ซึ่งในการทำตัวอย่างแห้งแบบเยือกแข็งของ IgG ยังสามารถเจือจาง IgG ได้ในระดับต่ำกว่า 1:800 ได้อีก จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำปฏิกิริยาระหว่าง IgG แต่ละระดับความเจือจางกับโปรตีน EPSPS ที่ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวทุกระดับความเจือจางของ IgG ยังคงตรวจสอบโปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 7) เพราะการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการรักษาโครงสร้างของ IgG ให้คงคุณสมบัติของอิพิโทปที่ดีในการตรวจจับโปรตีนเป้าหมาย เพราะฉะนั้นการเคลือบไมโครเพลทด้วย IgG ที่มีความจำเพาะเจาะจงจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำไปตรวจสอบโปรตีนพืชดัดแปรพันธุกรรมที่มีการปนเปื้อนในระดับต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

**ตารางที่ 7** ผลการตรวจสอบระดับความเจือจางของ IgG ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งทดสอบกับโปรตีน EPSPS ที่ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| ระดับความเจือจางของ IgG | ค่า $A_{405}$ | | | | | | ผลการทดสอบ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | ค่าเฉลี่ย | |
| Negative | 0.426 | 0.397 | 0.336 | 0.419 | 0.376 | 0.390 | - |
| 1:100 | 3.552 | 3.528 | 3.521 | 3.525 | 3.575 | 3.540 | + |
| 1:200 | 3.596 | 3.571 | 3.564 | 3.577 | 3.580 | 3.577 | + |
| 1:400 | 3.636 | 3.612 | 3.626 | 3.634 | 3.639 | 3.629 | + |
| 1:800 | 3.667 | 3.615 | 3.608 | 3.607 | 3.624 | 3.624 | + |

**หมายเหตุ** - ค่า $A_{405}$ เฉลี่ยจาก 5 ซ้ำจากการอ่านผลที่เวลา 15 นาทีหลังจากเติมสับสเตรท
- ผลการทดสอบ – คือ ไม่เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS
- ผลการทดสอบ + คือ เกิดปฏิกิริยา IgG-EPSPS

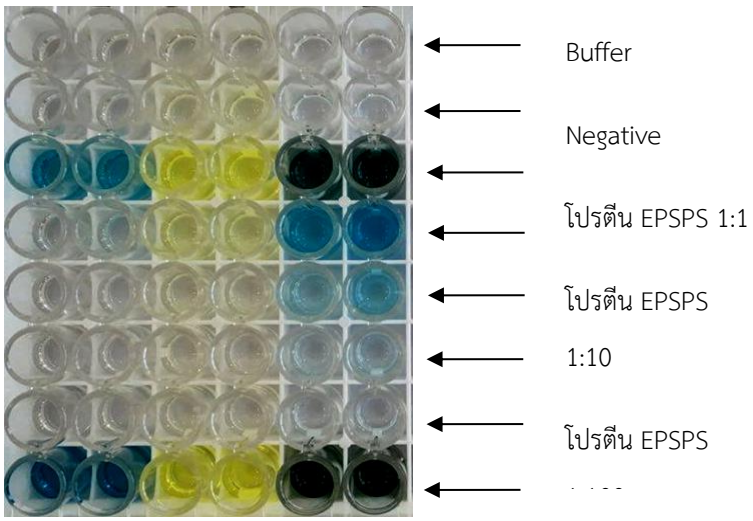
**ผลการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม**

จากการเจือจางโปรตีน EPSPS ในผงถั่วเหลืองที่ 4 ระดับความเจือจาง พบว่าเมื่อเลือกใช้ AP และ HRP เป็นสับสเตรทสามารถตรวจสอบ โปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจางที่ 1:1, 1:10 ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ $OD_{405}$ เท่ากับ 3.784 และ 2.490 เมื่อใช้สับสเตรทชนิด AP สำหรับสับสเตรทชนิด HRP ให้ค่าดูดกลืนแสงที่ $OD_{405}$ เท่ากับ 2.490 และ 0.633 เมื่อใช้แอนติบอดีที่ระดับความเจือจาง 1:200 อ่านผลการตรวจสอบที่ระยะเวลา 30 นาที หลังจากเติมสับสเตรท แต่เมื่อทิ้งระยะเวลาการตรวจสอบไว้ที่ 60 นาที ตัวอย่างที่ใช้สับสเตรทชนิด AP มีแนวโน้มให้ผลการทดสอบลวง (false positive) กับ negative control เพราะฉะนั้นชนิดของสับสเตรทที่ควรเลือกใช้ในการพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit คือ ชนิด HRP อีกทั้งสับสเตรทดังกล่าวให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนกว่า AP สับสเตรท พบว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นให้ผลการตรวจสอบโปรตีน EPSPS สอดคล้องกับ (Agdia ELISA kit) และสามารถตรวจสอบโปรตีนได้ในระดับความเจือจางที่ 1:100 ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ดีกว่า Agdia ELISA kit ถึง 100 เท่า เมื่อใช้ HRP เป็นสับสเตรทและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับ negative control และ Extraction buffer (ภาพที่ 5)

**ตารางที่ 8** ผลการทดสอบความใช้ได้ของชุดตรวจสอบ ELISA kit ในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ที่ระดับความเจือจางต่างๆ ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA

| ระดับความเจือจางของ IgG | ผลการทดสอบ | | |
|---|---|---|---|
| | Agdia[/1] | IgG-EPSPS-AP[/2] | IgG-EPSPS-HRP[/3] |
| Buffer | - | - | - |
| Negative | - | - | - |
| Positive | + | + | + |
| 1:1 | + | + | + |
| 1:10 | - | + | + |
| 1:100 | - | - | + |
| 1:1,000 | - | - | - |
| 1:10,000 | - | - | - |

**หมายเหตุ**
- Agdia[/1] ใช้แอนติบอดี Agdia เจือจาง 1:200
- IgG-EPSPS-AP[/2] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด AP
- IgG-EPSPS-HRP[/3] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด HRP
- อ่านผลการตรวจสอบที่ 30 นาทีหลังเติมสับสเตรท




**ภาพที่ 5** ผลการทดสอบโปรตีน EPSPS ด้วยเทคนิค indirect ELISA เมื่อทดสอบด้วย แอนติบอดี Agdia เจือจาง 1:200 แอนติบอดี IgG-EPSPS-AP[/2] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด AP IgG-EPSPS-HRP[/3] ใช้แอนติบอดีเจือจาง 1:200 สับสเตรทชนิด HRP อ่านผลการตรวจสอบที่ 30 นาทีหลังเติมสับสเตรท

การพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit ต้นแบบ เพื่อใช้ในการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมและการขยายผลในเชิงพาณิชย์ โดยการตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ชนิด 96 หลุม ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างได้ 48 ตัวอย่าง ชุดตรวจสอบ 1 ชุดประกอบด้วย

| รายการ | ปริมาณ |
|---|---|
| - ไมโครเพลทชนิด 96 หลุม | 1 เพลท |
| - IgG-EPSPS 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร | 1 หลอด |
| - secondary antibody-HRP | 1 หลอด |
| - TMB substrate | 25 มิลลิลิตร |
| - Extraction buffer | 25 มิลลิลิตร |
| - skim milk | 6 กรัม |
| - PBST buffer | 400 มิลลิลิตร |
| - PBS | 200 มิลลิลิตร |
| - Positive control | 1 หลอด |

**วิธีการใช้**

1. บดตัวอย่างถั่วเหลืองที่จะตรวจสอบหาใน Extraction buffer อัตราส่วน 1:10 ดูดส่วนใสปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างในไมโครเพลทที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน หรือ ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

2. เติม blocking solution (2% skim milk ที่ละลายใน PBST) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

3. เติม IgG-EPSPS 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจาง 1: 200 ใน blocking solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

4. เติม secondary antibody-HRP เจือจาง 1:10,000 ใน blocking solution หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ล้างไมโครเพลทด้วย PBST buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ครั้งละ 3 นาที จำนวน 3 ครั้ง

5. เติม TMB substrate หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มในกล่องปิดแสงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที อ่านผลการตรวจสอบที่วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ($A_{405}$) ด้วยเครื่อง ELISA microplate reader กำหนดค่าที่มากกว่า 2 เท่าของ Negative control ผลการตรวจสอบว่าเป็นถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม

**9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ**

สังเคราะห์ยีน *EPSPS* ขนาด 1,368 bp โคลนเข้าสู่ expression vector pET 200/D-TOPO® แล้วถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* BL21 เพิ่มปริมาณโปรตีนในระบบเซลล์แบคทีเรีย แล้วทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยใช้ Ni-NTA ผลการตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบโปรตีนขนาด 52 กิโลดาลตัน ถูกชะออกมาที่ elution buffer pH 4.5 ใช้โปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นแอนติเจนในการผลิตแอนติบอดี และได้เจาะเลือดกระต่ายเพื่อเก็บแอนติซีรัมจำนวน 10 ครั้ง มาแยกสกัด IgG ด้วยชุดสกัด protein A นำโปรตีน EPSPS และ IgG มาพัฒนาชุดตรวจสอบ ELISA kit โดยพัฒนาโปรตีนและแอนติบอดีในรูปแบบแห้งแบบเหยือกแข็ง เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจสอบระหว่างแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นกับแอนติบอดีทางการค้า พบว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นสามารถให้ผลการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ได้ดีกว่าแอนติบอดีทางการค้าเมื่อให้อัตราส่วนความเข้มข้นเดียวกัน แสดงว่าแอนติบอดีที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบโปรตีน EPSPS ในถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมได้เป็นอย่างดีเหมาะสำหรับใช้พัฒนา ELISA kit ในเชิงพาณิชย์ แต่อย่างไรก็ตามชุดตรวจสอบที่ได้พัฒนาขึ้นยังมีประสิทธิภาพดีเฉพาะการตรวจถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมในต้นสดได้ดีกว่าในส่วนของผลิตภัณฑ์แปรรูป จึงควรมีการวิจัยพัฒนาการสกัดโปรตีนจากผลิตภัณฑ์แปรรูป เพื่อนำมาใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect ELISA ต่อไป

**10.การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์**

- งานวิจัยได้โคลนสำหรับผลิตโปรตีนที่สามารถนำมาใช้ผลิตแอนติบอดีทั้งชนิดโพลีโคลนอลและโมโนโคลนอลแอนติบอดี เพื่อตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม แอนติบอดีที่ผลิตขึ้นสามารถจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ลดการนำเข้าแอนติบอดีจากต่างประเทศได้

- สามารถผลิตชุดตรวจสอบ ELISA kit เพื่อจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ ลดการนำเข้าชุดตรวจสอบจากต่างประเทศ

- โปรตีน EPSPS บริสุทธิ์สามารถเพิ่มปริมาณในระบบเซลล์แบคทีเรีย เก็บไว้ในรูปแบบแห้งเพื่อใช้เป็น Positive control สำหรับการตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมทางด้านโปรตีน และจัดจำหน่ายในเชิงพาณิชย์

- ได้งานวิจัยที่เป็นต้นแบบในการวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการตรวจสอบพืชหรือจุลินทรีย์ดัดแปรพันธุกรรม ลดปริมาณและการใช้สารเคมี ลดขั้นตอนการตรวจวิเคราะห์ ลดเวลาและค่าใช้จ่าย ทุกขั้นตอนกระบวนการดำเนินงานวิจัยได้มาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถเก็บไว้ใช้พัฒนาและเพิ่มมูลค่าขยายผลเพื่อต่อยอดในเชิงพาณิชย์

**11. เอกสารอ้างอิง**


ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์, ศรีเฉม ชาวโพงพาง, ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, สุรภี กีรติยะอังกูร, กิ่งกาญจน์ พิชญกุล, อลงกรณ์ กรณ์ทอง . 2552. การโคลนยีน *EPSPS* และผลิตแอนติบอดีในระบบเซลล์เพื่อผลิตชุดตรวจสอบถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Roundup Ready). สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. 51 หน้า

นิรนาม. 2547. รายงานเรื่อง “ข้อเสนอทางเลือกนโยบายพันธุวิศวกรรมและความปลอดภัยทาชีวภาพ ของประเทศไทย”. 31 หน้า.

Berdal, K.G. and Holst-Jensen, A. 2001. Roundup Ready Soybean Event-specific Real-time Qualitative PCR Assay and Estimation of the Practical Detection and Quantification limit in GMOSO Analysis. **European Food Research and Technology**. 213 : 432-438.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitivity method of measuring microorganism quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye coupling. **Anal. Biochem.** 72: 248-264.

Clark, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. **J. Gen. Virol** 34: 475-483.

Honghong Wu , Yu Zhang , Changqing Zhu , Xiao Xiao , Xinghu Zhou , Sheng Xu , Wenbiao Shen and Ming Huang. 2012. Presence of CP4-EPSPS Component in Roundup Ready Soybean-Derived Food Products. **J. Mol. Sci**. 13: 1919-1932.

Wei Wang. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutics**. 203: 1-60

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1– 3.

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.agriman.doae.go.th/home/agri1/agri1.3/strategics_2554/02_Soybean.pdf (1-05-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.agriman.doae.go.th/home/agri1/agri1.3/strategics_2554/02_Soybean.pdf (1-05-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต : http://www.envfor.nic.in/divisions/csurv/biosafety/Gef2/T5/12%20Dr.%20Celia_ELISA%20based%20detection%20of%20LMOs.pdf (2-05-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

(http://ceraGMOsc.org/index.php?action=GMOs_crop_database&mode=ShowProd&data=MON89788) (18-07-2011)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

(http://www.jsunitech.com/product/fkit/neogen/rCP4.pdf) (25-04-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

Mette Lübeck. (n.d.) Detection of genetically modified plants. http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/REPORT_rev_maj.pdf (1-05-2013)

เข้าถึงได้จากอินเตอร์เน็ต :

http://www.thaiswine.org/Portals/4/บทความ/นโยบายและมาตรการการนำเข้ากากถั่วเหลือง.pdf